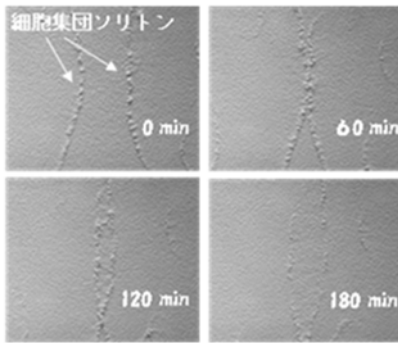


逆遺伝学的手法による細胞性粘菌のソリトン様運動関連遺伝子の探索

吉田 健太郎 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 桑山 秀一 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

細胞性粘菌は土壌に生息する社会性真核アメーバ細胞である。細胞性粘菌は普段は単細胞生物として増殖する。しかし飢餓状態におかれると細胞同士が走化性応答により集合し、その後集団で移動する多細胞体となり、最終的には孢子細胞と柄細胞に分化するというユニークな生活環を持っている。また、培養系も確立されており実験室での扱いも簡便であり、様々な遺伝学的、分子生物学的手法が利用できるため細胞運動や細胞間相互作用、細胞分化や形態形成の研究をする上で優れたモデル生物として利用されている。



先行研究において、ある非走化性突然変異株の細胞集団が物理現象のソリトン波(他の波の干渉を受けず、形状や速度が一定の孤立波)によく似た運動を行うことが発見された(Kuwayama and Ishida 2013)。この細胞性粘菌のソリトン様運動は時に構成する細胞を入れ替えながらも、その形状やサイズ、運動の向きや速さを変えないこと、またソリトン波様細胞集団運動同士の衝突において細胞が入り替わりながらも見かけ上すり抜けることが観察された。これらの観察は、ソリトン波様の形状や運動量には記憶が存在し、その記憶は構成され、この細胞集団運動ソリトン現象は、多細胞生物の発生における形態形成の普遍的なメカニズムの一端を示していると推測し、現在所属研究室では生物学的、数理科学的な解析が行われている。しかしながらこの非走化性株が示すソリトン様運動が野生株のどのような遺伝子の機能変化によるものかはまた明らかになっていない。

ソリトン様運動を行う KI-5 株、KI-10 株は、親株である XP55 株にランダムに変異を引き起こし作成された株である(Kuwayama et.al, 1993)。昨年度までの先行研究では、次世代シーケンサーを用いた解析により、ソリトン株(KI-5 株、KI-10 株)、また親株である XP55 株の全ゲノム DNA の配列決定が行われた。さらに、bowtie2 と bwa のプログラムを用いて、配列を比較し、変異箇所のマッピングをすることによって変異遺伝子を明らかにした。

本研究では判明した変異遺伝子からの責任遺伝子の同定を目的とした。同定方法は、明らかになった変異遺伝子に対する正常遺伝子をクローニングし発現コンストラクトを作製、ソリトン株(KI-5 株)に形質転換による遺伝子導入を行うことによって、野生株へと表現型を回復する遺伝子の探索を行った。

材料と方法

(1) total cDNA の作製

野生株 (AX2 株) の細胞を 0 h、4 h、8 h 飢餓状態におきそれぞれから total RNA を抽出した。これらを混合した total RNA

を鋳型として、逆転写酵素とオリゴ dT プライマーを用いて cDNA library を合成した。

(2) 変異遺伝子の cDNA インサートの作製

変異遺伝子のうち、サイレント変異等を除いた 52 個の変異遺伝子に対して、制限酵素配列を付加した PCR プライマーを作製し、cDNA library を鋳型に PCR 法による増幅を行った。これらの PCR 産物を Zero Blunt®TOPO®PCR Cloning Kit を用いてクローニング、配列をサンガーシーケンシング法により確認した。

(3) 発現コンストラクトの作製

細胞性粘菌の遺伝子発現コンストラクトは、染色体外で複製型シヤトルベクターである *pHK12bla,pHK12neo* を使用した。これらのベクターに、上記で作製した正常遺伝子を組み込み、発現コンストラクトを完成させた。

(4) ソリトン運動株(KI-5 株)への形質転換

まず、振盪培養法により細胞密度が $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ cell/ml になるように調製した KI-5 細胞をエレクトロポレーション緩衝液で細胞密度が 5.0×10^7 cell/ml になるようにすみやかに懸濁をした。この細胞懸濁液 400 μ l と発現コンストラクト >1 μ g を混合しエレクトロポレーション法(500 V, 100 μ sec \times 10)による遺伝子導入を行った。その後、選択薬剤(BlasticidinS もしくは G418)を加えて、細胞の増殖が確認されるまで (10~14 日) 培養を行った。

(5) 表現型の観察

細胞が十分に増えたシャーレから細胞を分取し、餌となるバクテリア(*Klebsiella aerogenes*)を撒いた A-medium 寒天培地に植えた。10~14 日ほど 21 $^{\circ}$ C で培養を行い、ソリトン様細胞集団の形成の有無、集合能や子実体形成能の獲得などを視点として表現型を観察した。

結果と考察

52 個の変異遺伝子のうち、6 個の遺伝子について発現コンストラクトを作製し、遺伝子導入を行った。そのうち 5 個の遺伝子では集合能やソリトン様運動の変化は観察されなかった。1 個の遺伝子導入株では KI-5 株に比べてソリトン様運動の消失が観察された。この株においては、今後導入遺伝子の発現確認や細胞集団運動の詳細な観察を行う必要がある。

現在、その他 46 個の変異遺伝子については形質転換体の選択や現在発現コンストラクト作製中であり、卒業研究発表会には結果を更新する予定である。

今後の展望

これまでのところ責任遺伝子の同定には至っていないが、引き続き残りの変異遺伝子についても解析を進める予定である。候補責任遺伝子が判明次第、野生株の遺伝子破壊や変異遺伝子導入を行い責任遺伝子の確定を行う。また責任遺伝子が判明したら、細胞活動においてどのように機能に関わりソリトン様運動を引き起しているのかを生化学的、細胞学的手法により分子レベルで詳しく解析する予定である。